



*Institut de Recherches Agronomiques Tropicales
et des cultures vivrières*

*Département du Centre de Coopération Internationale
en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD)*

PROJET FAO / AGLF / TCP / BDI / 6756

**EVALUATION DES POSSIBILITES D'UTILISATION
DE LA TOURBE DE GISOZI (BURUNDI)
COMME SUPPORT D'INOCULUM**

P. BEUNARD, P. SALEZ, H. SAINT MACARY

Juin 1989

D.R.N./Biologie/N° 2

PROJET FAO / AGLF / TCP / BDI / 6756

**EVALUATION DES POSSIBILITES D'UTILISATION
DE LA TOURBE DE GISOZI (BURUNDI)
COMME SUPPORT D'INOCULUM**

P. BEUNARD, P. SALEZ, H. SAINT MACARY

Juin 1989

D.R.N./Biologie/N° 2

INTRODUCTION

La fabrication d'inoculums pour légumineuses nécessite la culture des bactéries spécifiques (*Rhizobium* ou *Bradyrhizobium*) en concentrations élevées et leur mélange avec un support poudreux qui a pour but de faciliter la manutention et l'application sur les semences du produit tout en favorisant au maximum la survie des microorganismes symbiotiques.

La culture des rhizobiums se fait au laboratoire dans des milieux de composition définie (1) et ne variant pas ou peu selon les lieux de production. Par contre le support poudreux, qui doit être disponible localement à bas prix, peut varier d'un endroit à un autre. Il importe donc, avant d'envisager une production de masse d'inoculums de rechercher un support présentant de bonnes qualités et pouvant être utilisé localement. De telles recherches ont abouti avec succès dans différents projets de la FAO (2, 3) et se poursuivent pour de nouveaux pays.

Au Burundi, où une unité de production d'inoculums pour légumineuses a été créée au sein de l'ISABU avec le soutien du Programme de Coopération Technique de la FAO, un support de bonne qualité n'avait pas encore été identifié avec certitude.

Les premières études réalisées en 1984 avaient permis de préparer le cadre du travail dont les résultats sont présentés dans le présent document.

Classiquement, le support le plus utilisé pour les inoculums est la tourbe broyée. Le Burundi possède de nombreux gisements de tourbe, d'importance variable, notamment à IJENDA, GISOZI et MATANA.

L'un des gisements (GISOZI) fait aujourd'hui l'objet d'une exploitation industrielle par la société ONATOUR qui commercialise la tourbe extraite sous forme de briquettes compactées au prix de 2 Francs Burundais le kilo. On dispose donc là d'une source de tourbe de qualité relativement stable et de prix peu élevé, qui méritait d'être étudiée quant à ses qualités physico-chimiques et microbiologiques.

1. - MATERIELS UTILISES

1.1. Tourbe

Elle provient de la région de GISOZI, à une soixantaine de km à l'Est de Bujumbura sur la crête Zaïre-Nil à une altitude de 2 000 m environ. Avant son analyse et son incorporation dans les expérimentations, cette tourbe a été séchée à 70° C à l'étuve, broyée et tamisée à 0,5 mm.

1.2. Souches bactériennes

Deux souches ont été utilisées dans l'étude portant sur la survie des bactéries :

- IRAT FA3, *Bradyrhizobium japonicum* spécifique du soja.
- CIAT 899, *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, spécifique du haricot.

2. - ANALYSE CHIMIQUE DU SUPPORT

L'ensemble des résultats est récapitulé dans le tableau 1.

Tableau 1. CARACTERISATION CHIMIQUE
DE LA TOURBE DU BURUNDI

ELEMENTS	UNITES	TENEURS
MATIERE ORGANIQUE	%	49.40
CARBONE ORGANIQUE	%	28.72
AZOTE TOTAL	°/oo	6.58
Rapport C/N		43.60
pH eau (20g/50ml)		3.97
<u>ELEMENTS SOLUBLES</u>		
(Extrait 1/10)		
Conductivité	µ Siemens	228.00
pH extrait 1/10		6.35
CALCIUM	ppm	66.10
MAGNESIUM	ppm	29.10
POTASSIUM	ppm	109.60
SODIUM	ppm	148.00
CHLORE	ppm	221.00
SULFATE	ppm	167.00
NITRATE	ppm	7.50
AMMONIUM	ppm	126.00
FER	ppm	22.50
ALUMINIUM	ppm	69.00
PHOSPHORE	ppm	2.80

Les différences des valeurs observées entre le pH eau (extrait 1/10) et le pH eau mesuré dans les conditions habituelles (20 g dans 50 ml d'eau distillée) résultent des différences de proportion eau/support. L'eau distillée neutralise en partie l'acidité de la tourbe.

Les résultats montrent que le support est très acide et qu'il conviendra sans doute d'effectuer une neutralisation avant toute utilisation.

Pour les éléments principaux de la matière organique, on remarque que le taux de carbone est élevé alors que la teneur en azote est faible, ce qui donne un rapport C/N très élevé : 43,6. D'après des études antérieures (4), ces résultats permettent de classer la tourbe du Burundi à la limite des composés organiques évolués et des matières organiques fraîches, ce qui n'est pas un élément favorable pour une bonne survie des rhizobiums.

Parmi les éléments solubles seule la teneur en ammonium semble élevée mais reste cependant dans des proportions non toxiques pour les rhizobiums.

3. - NEUTRALISATION DU SUPPORT

3.1. Mode opératoire

Un échantillon de 20 g de la tourbe étudiée est placé dans un becher de 100 ml et 50 ml d'eau distillée sont versés dans ce becher. Le mélange est agité pendant 10 mn à l'aide d'un barreau magnétique. Le pH de la solution est alors mesuré.

Afin d'obtenir une courbe de neutralisation complète, 50 mg de carbonate de calcium pur sont ajoutés toutes les dix minutes et le pH est mesuré avant chaque nouvel ajout.

3.2. Résultats

Les résultats, présentés dans le tableau 2 et la figure 1 montrent que le pH de départ très acide de la tourbe étudiée nécessite l'addition de quantités importantes de tourbe pour obtenir une neutralisation. Il faut environ 3 % de carbonate de calcium pour obtenir un pH supérieur à 6.

Cette valeur de 6 est satisfaisante pour les rhizobiums mais par sécurité il semble préférable de relever encore le pH pour bénéficier d'une marge où le pH sera tamponné. Dans la suite de l'étude, il a donc été décidé d'ajouter 4 % de carbonate de calcium à la tourbe, ce qui correspond à un pH final d'environ 6,3.

4. - CAPACITE DE RETENUE EN EAU DU SUPPORT

La survie des bactéries dépend de la quantité de culture liquide mélangée au support. Une trop grande humidité peut asphyxier les rhizobiums et au contraire une quantité trop faible peut entraîner une dessiccation et accélérer la mortalité des bactéries.

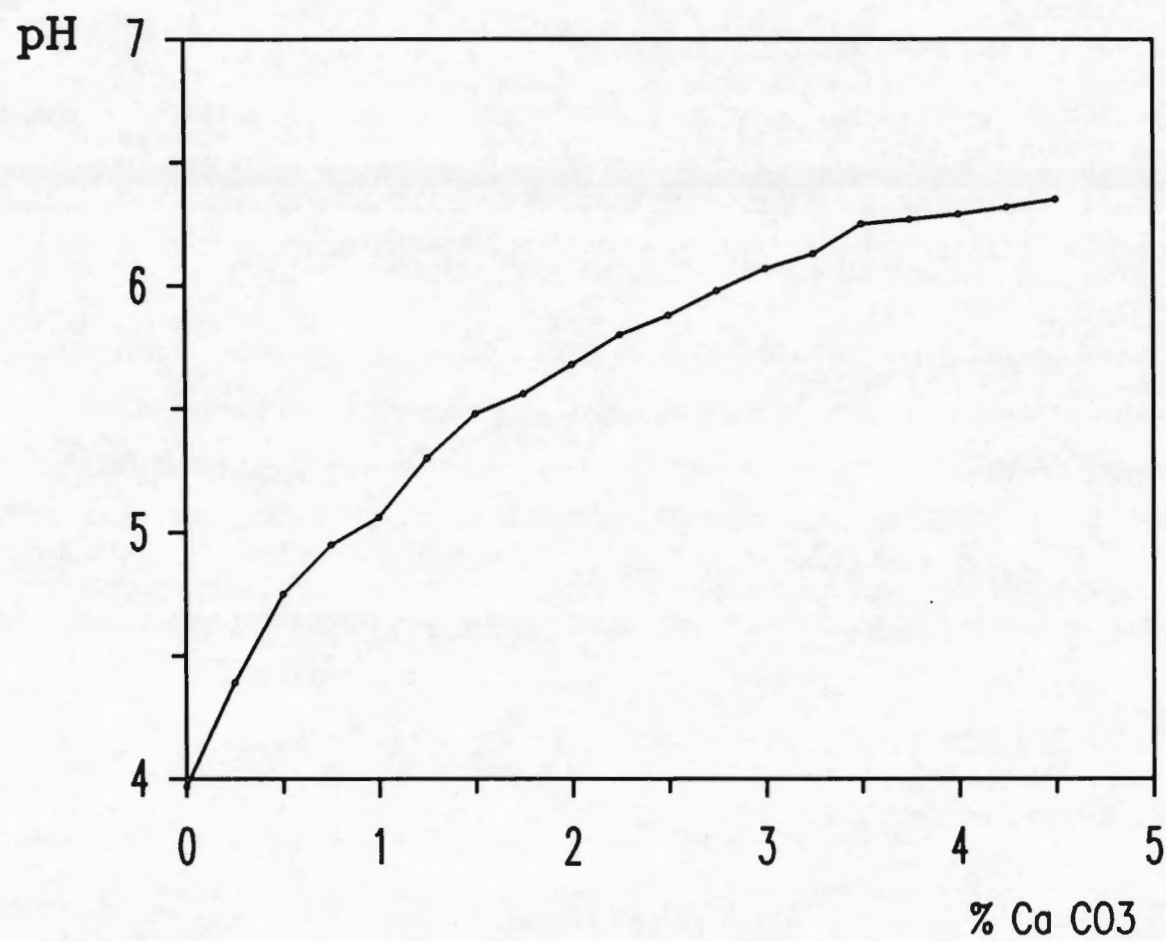
4.1. Mode opératoire

Vingt grammes de tourbe sont mis en suspension dans 50 ml d'eau distillée sur agitateur magnétique. Au bout de 15 mn, la suspension est filtrée sur papier dans une éprouvette graduée et le volume du percolat est mesuré.

Tableau 2. NEUTRALISATION DE LA TOURBE DU BURUNDI
PAR AJOUT DE CARBONATE DE CALCIUM

CaCO_3 (mg)		% CaCO_3 par rapport à la tourbe		pH
0	!	0.00	!	3.97
50	!	0.25	!	4.39
100	!	0.50	!	4.75
150	!	0.75	!	4.95
200	!	1.00	!	5.06
250	!	1.25	!	5.30
300	!	1.50	!	5.48
350	!	1.75	!	5.56
400	!	2.00	!	5.68
450	!	2.25	!	5.80
500	!	2.50	!	5.88
550	!	2.75	!	5.98
600	!	3.00	!	6.07
650	!	3.25	!	6.13
700	!	3.50	!	6.25
750	!	3.75	!	6.27
800	!	4.00	!	6.29
850	!	4.25	!	6.32
900	!	4.50	!	6.35

Figure 1. Neutralisation de la
tourbe du Burundi.



La différence entre les 50 ml d'eau distillée de départ et le volume du percolat recueilli dans l'éprouvette constitue la capacité maximale de retenue du support. Cette valeur obtenue est rapportée ensuite au poids de l'échantillon et exprimée en pourcentage.

4.2. Résultats

Deux répétitions de cette mesure ont été effectuées. Les volumes de filtrat obtenus ont été de 29 ml et 30 ml pour un mélange de 50 ml d'eau avec 20 g de tourbe.

La capacité maximale de rétention en eau du support est donc comprise entre 100 et 105 ml de liquide pour 100 g de tourbe.

Les normes internationales (5) recommandent d'établir pour les inoculums un mélange culture bactérienne-support dans lequel le liquide injecté représente entre 40 et 60 % de la capacité maximale de rétention. Dans le cas de la tourbe étudiée ceci correspond à une valeur de 40 ml à 60 ml de liquide pour 100 g de tourbe. La valeur de 60 ml pour 100 g de tourbe a été retenue pour la suite de l'étude.

5. - SURVIE DES RHIZOBIUMS DANS LA TOURBE DU BURUNDI

5.1. Conditionnement de la tourbe

Après neutralisation avec 4 % de carbonate de calcium la tourbe est répartie en sachets de polyéthylène moyenne densité d'épaisseur 150 microns à raison de 50 g par sachet. Deux sachets de tourbe non neutralisée ont été conservés comme témoins. L'ensemble des sachets est stérilisé par passage à l'autoclave trois fois à 120°C pendant 20 mn à 24 h d'intervalle.

5.2. Cultures liquides

La multiplication des bactéries est effectuée dans un erlenmeyer contenant un litre de milieu Yeast Extract Mannitol (1). Après ensemencement sous hotte à flux lumineuse avec la souche étudiée, la culture est placée sur agitateur orbital dans une enceinte régulée à 28°C.

Deux cultures différentes ont été réalisées (IRAT FA3 et CIAT 899), afin d'examiner si la survie varie selon l'espèce. Le transfert des cultures liquides dans les sachets de tourbe stérilisée est réalisé sous hotte stérile à l'aide d'un distributeur préalablement stérilisé. Le volume de liquide introduit dans chaque sachet est fonction de la capacité de retenue calculée précédemment.

Une fraction adéquate de chaque suspension bactérienne est conservée afin d'effectuer un dénombrement de départ. La densité des cultures injectées était de $5,7 \times 10^8$ bactéries par ml pour CIAT 899 et $4,0 \times 10^8$ bactéries par ml pour IRAT FA3.

Après cette préparation la moitié des sachets d'inoculum est conservée à température ambiante (25°C), l'autre moitié est placée en chambre froide à 4°C.

5.3. Dénombrements

Les dénombrements sont échelonnés durant 75 jours afin de suivre la survie des bactéries sur la tourbe. La technique utilisée est celle du comptage sur boîtes de Pétri après dilutions successives (6).

5.4. Résultats

Les résultats obtenus (tableau 3 et figure 2) montrent qu'il existe une différence de survie entre les deux souches de rhizobium. On observe une survie satisfaisante à température ambiante de CIAT 899, souche de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. Après 75 jours les sachets d'inoculum contenant CIAT 899 possèdent encore plus de 10^9 bactéries par g. Pour IRAT FA3, souche de *Bradyrhizobium japonicum*, après 58 jours, le nombre de bactéries chute à une valeur inférieure à 10^8 bactéries par g d'inoculum valeur considérée comme minimum pour avoir des inoculums de bonne qualité.

Cette chute est cependant ralentie lorsque les inoculums contenant IRAT FA3 sont conservés en chambre froide et le nombre de bactéries par g d'inoculum demeure supérieur à 10^8 après 60 jours dans ces conditions.

Dans les sachets non neutralisés conservés comme témoin, la mortalité des rhizobiums a été très élevée puisque dès le premier comptage (8 jours) après ensemencement, aucune bactérie vivante n'a pu être détectée. Ce résultat confirme la nécessité absolue de neutraliser la tourbe de GISOZI avant son utilisation comme support d'inoculum.

6. - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

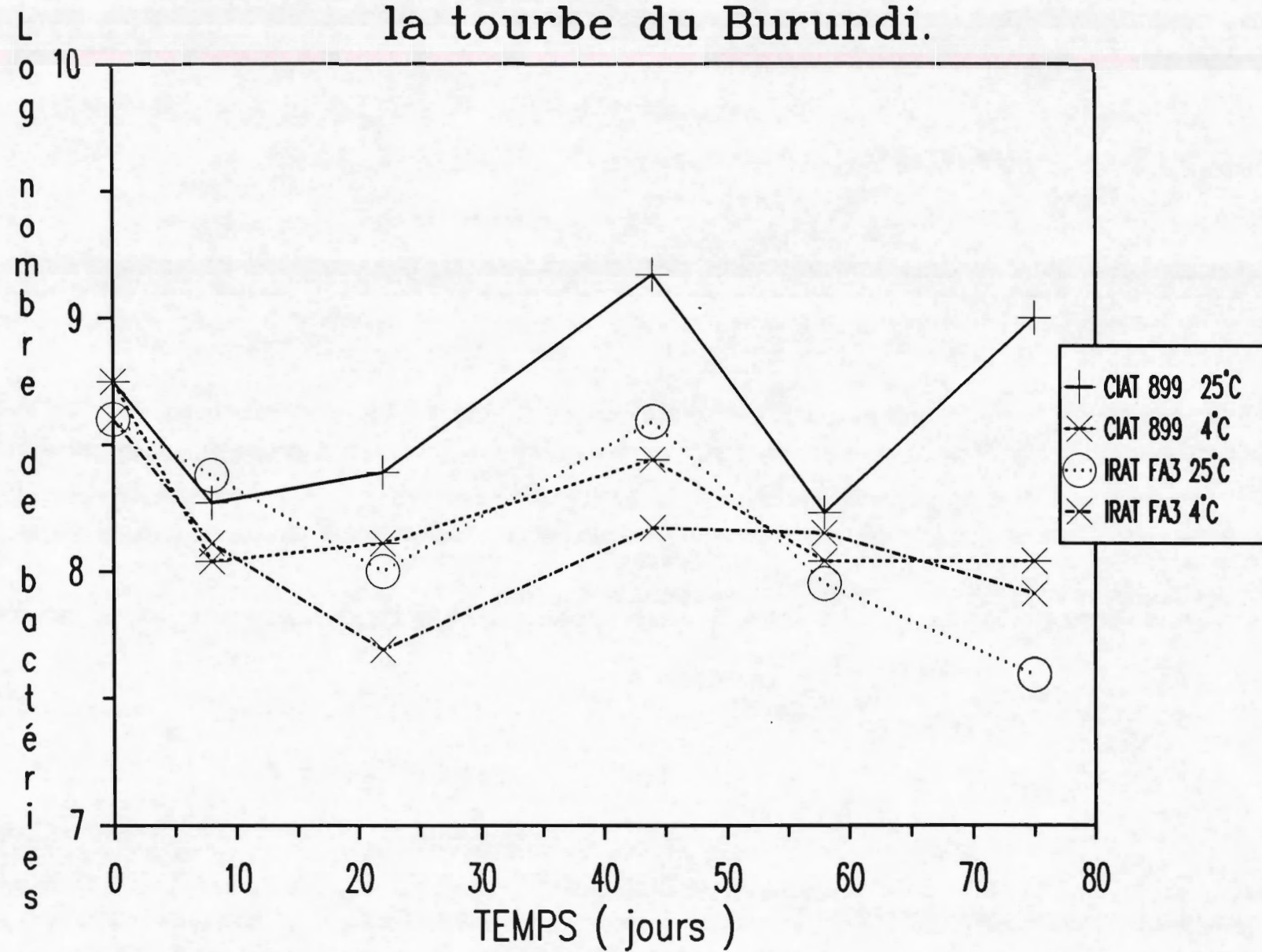
Le principal facteur nécessitant le respect de précautions lors de l'utilisation de la tourbe étudiée est le pH. Une neutralisation est indispensable, avec pour chaque lot de tourbe traité une vérification du résultat obtenu. La matière de départ n'étant pas en effet forcément très homogène, le résultat obtenu dans cette étude de neutraliser avec 4 % de carbonate de calcium ne doit pas être considéré comme permanent. La détermination de la quantité de chaux à apporter n'est cependant pas difficile à contrôler et devrait pouvoir être effectuée sur place sans problème.

**Tableau 3. SURVIE DE DEUX SOUCHES DE RHIZOBIUM
DANS LA TOURBE DU BURUNDI**

Résultats exprimés en Log du nombre de bactéries par gramme

TEMPS (jours)	CIAT 899 <u>Rhizobium leguminosarum</u> biovar <u>phaseoli</u>		IRAT FA3 <u>Bradyrhizobium japonicum</u>	
	25°C	4°C	25°C	4°C
0	8.75	8.75	8.60	8.60
8	8.27	8.04	8.38	8.11
22	8.39	8.11	8.00	7.69
44	9.17	8.44	8.59	8.17
58	8.23	8.04	7.95	8.15
75	9.00	8.04	7.59	7.91

Figure 2. Survie des rhizobium dans la tourbe du Burundi.



Les différences de survie observées entre les souches après 75 jours conduisent à dire qu'il pourrait être bon d'adopter un système de conservation différent selon les inoculums, ceux fabriqués avec les souches pour haricot pouvant être conservés à température ambiante, ceux pour le soja nécessitant une conservation en chambre froide pour le long terme. Ceci n'est cependant pas une obligation et compte tenu de la survie satisfaisante des deux souches pendant 60 jours à température ambiante il serait sans doute plus simple de prévoir la production des inoculums environ un mois avant leur utilisation et leur distribution.

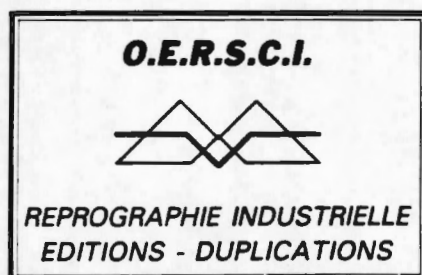
Ceci laisserait encore un délai d'un mois avant leur utilisation, ce qui semble raisonnable. Il serait cependant alors souhaitable de retirer après ce délai les inoculums non utilisés.

Dans l'avenir, on peut cependant également penser que les conditions de survie des rhizobiums dans la tourbe du Burundi seront précisées plus complètement que dans la présente étude et que les responsables de l'UPIIL de Bujumbura amélioreront encore les conditions de survie des rhizobiums dans ce support, contribuant ainsi à la production d'inoculums de haute qualité et à durée d'utilisation allongée.

REFERENCES CITEES

- 1 - VINCENT J.M., 1970
A manual for the practical study of root nodule bacteria.
Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, 164 p.
- 2 - BEUNARD P. ; MARTIN du PONT S. ; SAINT MACARY H., 1986
Evaluation of three peat soils from Turkey for use as inoculant carriers for *Rhizobium* spp.
IRAT Montpellier DA/16 - 18 p
- 3 - BEUNARD P. ; SEMAVOINE L. ; SAINT MACARY H., 1988
Evaluation of filtermud from sugar factories as a possible inoculant carrier in Tanzania. IRAT Montpellier DRN/Biologie/N°5 - 14 p.
- 4 - BEUNARD P. ; SAINT MACARY H., 1988
Caractérisation et choix de supports pour inoculums.
Communication présentée à la 3ème Conférence de l'AABNF - Dakar (Sénégal) - 7 - 12 Novembre 1988
- 5 - ROUGHLEY R.J., 1968
Some factors influencing the growth and survival of root nodule bacteria in peat culture
J. Appl. Bact. 31 : 259-265
- 6 - FAO, 1984
Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote
Rhizobium/Légumineuses - Rome.

*Office d'Édition de la Recherche Scientifique
et Coopération Internationale*



*Parc Modulopolis H 1 Zone Euromédecine
Montpellier 67.52.20.05*